

## ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DAUN KESEMEK (*Diospyros kaki* Thunb.) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL)

### ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT COMPOUND OF PERSIMMON LEAVES (*Diospyros kaki* Thunb.) USING DPPH (2,2 DIPHENYL-1-PIKRILHIDRAZIL) METHOD

Isnindar<sup>1</sup>, Subagus Wahyuno<sup>2</sup>, Erna Prawita Setyowati<sup>2</sup>

1. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Keperawatan, Prodi farmasi, Universitas Tanjungpura

2. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

#### ABSTRAK

Antioksidan merupakan suatu substansi yang pada konsentrasi kecil secara signifikan mampu menghambat atau mencegah oksidasi pada substrat. Salah satu tumbuhan yang berkhasiat sebagai antioksidan adalah kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) yang banyak dibudidayakan di Asia Timur, Spanyol dan Indonesia. Dalam usaha pencarian senyawa antioksidan alami, telah dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan daun kesemek (*diospyros kaki* Thunb.) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Penyarian daun kesemek dilakukan secara maserasi dengan wasbenzen. Ekstrak didapat dengan menguapkan pelarut wasbenzen dengan rotavapor. Dengan cara yang sama residu dimaserasi kembali dengan metanol sehingga didapat ekstrak metanol. Ekstrak ini diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH 0,2%. Ekstrak aktif dipartisi dengan kloroform, metanol, air dan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH 0,2%. Hasil partisi aktif di KLTP dan diperoleh isolat aktif yang kemurniannya diuji secara KLT. Aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$ ) isolat aktif dianalisis menggunakan spektrofotometri. Hasil analisis aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$ ) isolat aktif sebesar 100,00  $\mu$ g/ml. Spektrum UV-Vis isolat aktif menunjukkan serapan  $\lambda_{max}$  285 dan 401 nm. Spektrum inframerah (KBr) menampilkan serapan pada 3446  $cm^{-1}$  (OH), 2926  $cm^{-1}$  ( $CH_{alifatik}$ ), 1456  $cm^{-1}$  ( $CH_2$ ), 1384  $cm^{-1}$  ( $CH_3$ ), 1255  $cm^{-1}$ , dan 1115  $cm^{-1}$  (C-O-C), 1631  $cm^{-1}$  (C=C<sub>aromatik</sub>). Spektra GC-MS memberikan 2 puncak dengan waktu retensi 11,408 menit dengan indeks kemiripan sebesar 79,243% dengan puncak ion molekul ( $M^+$ )<sup>+</sup> muncul pada m/z 178, 163, 147. Spektra ini diperkirakan methyl eugenol. Puncak dengan waktu retensi 12,982 menit dengan indeks kemiripan sebesar 20,757% menghasilkan spektrum massa dengan puncak ion molekul ( $M^+$ )<sup>+</sup> muncul pada m/z 192, 177, 161. Spektra ini diperkirakan senyawa myristicin.

Kata kunci: Daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.), isolasi, antioksidan, DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil)

#### ABSTRACT

Antioxidant is a substance which in small concentrations can significantly inhibit or prevent the oxidation of the substrate. One plant is efficacious as an antioxidant is the persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) where is cultivated widely in East Asia, Spain and Indonesia. In the search for natural antioxidant compounds, have been studied isolation and identification of antioxidant compound of persimmon leaves (*Diospyros kaki* Thunb.) using DPPH (2,2-diphenyl-1-pikrilhidrazil) method. The extraction of persimmon leaves was carried out by maceration method with wasbenzen. Extracts obtained by evaporating the solvent wasbenzenon a rotary evaporator and were then re-macerated with methanol. Antioxidant activity of extracts was evaluated with DPPH 0.2% method. Active extract was partitioned with chloroform, methanol, distilled water and tested for antioxidant activity by DPPH 0.2% method. The active compound was purified by PTLC and the purified active isolates was then confirmed by TLC. The antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) active isolates were analyzed using spectrophotometry. Analysis of active isolates resulted the antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) of 100.00  $\mu$ g / ml. UV-Vis spectrum of the active isolates showed absorption at  $\lambda_{max}$  285 and 401 nm. Infrared spectra (KBR) showed absorption at 3446  $cm^{-1}$  (OH), 2926  $cm^{-1}$  ( $CH_{aliphatic}$ ), 1456  $cm^{-1}$  ( $CH_2$ ), 1384  $cm^{-1}$  ( $CH_3$ ), 1255  $cm^{-1}$ , and 1115  $cm^{-1}$  (C-O-C), 1631  $cm^{-1}$  (C=C<sub>aromatic</sub>). GC-MS spectra gave two peaks with retention time 11.408 minutes with a similarity index of 79.243% with the molecular ion ( $M^+$ )<sup>+</sup> appeared at m/z 178, 163, 147. These spectra are expected to be methyl eugenol. Furthermore, the peak with retention

time 12.982 minutes with a similarity index of 20.757%, producing a mass spectrum with molecular ion peaks ( $M^+$ ) appeared at  $m/z$  192, 177, 161. These spectra are expected to be myristicin compound.

**Key words:** Leaf persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), isolation, antioxidant, DPPH (2,2-diphenyl-1-pikrilhidrazil)

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati terbesar kedua setelah Brazil. Diperkirakan sekitar 30.000 jenis tumbuhan ditemukan di dalam hutan Indonesia dan sekitar 1.260 jenis diantaranya berkhasiat sebagai obat. Tumbuhan yang berpotensi sebagai obat yang telah dibudidayakan saat ini masih sangat sedikit. Oleh karena itu, hutan Indonesia masih merupakan sumber plasma nutfah tumbuhan berkhasiat obat yang potensinya perlu digali secara sungguh-sungguh.

Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) termasuk keluarga Ebenaceae, dibudidayakan di daerah yang luas, seperti di Asia Timur, Spanyol, Israel dan Indonesia. Dilaporkan pada daun kesemek mengandung flavonoid, oligomers, tanin, asam organik, klorofil dan phenol yang berkhasiat sebagai antioksidan.

Antioksidan merupakan suatu substansi yang pada konsentrasi kecil secara signifikan mampu menghambat atau mencegah oksidasi pada substrat. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi menjadi 2 kelompok yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami, antioksidan sintetik yang diijinkan dan umum digunakan untuk makanan yaitu BHA, BHT, profil galat dan tokoferol sedangkan antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam organik polifungsional.

Perhatian besar beberapa tahun terakhir ini banyak diberikan kepada pengembangan antioksidan alami yang digunakan untuk tujuan pengobatan preventif. Mekanisme kerja antioksidan fenolik merupakan penangkap radikal yang poten. Senyawa fenolik, suatu komponen aktif secara biologik, merupakan zat yang dapat menyumbang hidrogen ke radikal bebas dan bahkan memecah rantai reaksi oksidasi lipid pada tahap inisiasi awal (Gulcindkk., 2004). Menurut

yang berhubungan dengan lipid peroksida dan pengujian yang berhubungan dengan elektron dan radikal bebas.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi isolat aktif sebagai antioksidan alami, mengetahui golongan isolat aktif antioksidan dan mengetahui struktur isolat aktif antioksidan dari daun kesemek.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) diperoleh dari lahan lereng Gunung Merapi. Pelarut metanol, kloroform, etil asetat, dan n-hexan. Lempeng silika gel F<sub>254</sub>, silika gel 60 PF<sub>254</sub>. Serium Sulfat, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), vitamin C, dan Kalium Bromida.

Spektrofotometer UV-Vis (Milton Roy Spektronik 3000 Array), IR (PERKIN ELMER FTIR 100), GC-MS (AGILENT GC 6890N 5975B MSD), peralatan gelas, neraca, blender, mikropipet, penangas air, lampu ultraviolet panjang gelombang 254 dan 336 nm, pipa kapiler, mikropipet, kompor listrik, oven, bejana kromatografi, centrifuge, vortex dan eksikator.

### Jalan penelitian

#### Isolasi senyawa aktif

Serbukdaun kesemek kering dimaserasi menggunakan metanol. Ekstrak metanol dipartisi dengan kloroform hingga diperoleh tiga fase yaitu fase larut kloroform (F I), fase larut metanol (F II) dan fase larut air (F III). Terhadap fase aktif (F II) dilakukan kromatografi preparatif menggunakan fase diam silika gel PF<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform-etilasetat (1:4v/v). Terhadap isolat aktif dilakukan analisis FT-IR dan GC-MS

### Uji Pendahuluan antioksidan penangkap radikal

Ekstrak metanol di KLT menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub>, dan fase gerak kloroform-etilasetat (1:4v/v). Bercak yang terbentuk disemprot dengan larutan 0,2% DPPH dalam metanol. Bercak diperiksa 30 menit setelah penyemprotan. (Demirezer dkk., 2001 ; Cavin dkk., 1998)

#### Penentuan aktivitas antioksidan

Sebanyak 1 ml DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah bahan uji isolat aktif pada berbagai konsentrasi. Selanjutnya ditambah pelarut hingga volume 5,0 ml, ditunggu

---

\*Korespondensi : Erna Prawita Setyowati  
Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM  
E-mail:

Moon dan Shibamoto (2009) pengujian aktivitas antioksidan untuk komponen tanaman dan makanan terbagi menjadi 2 bagian yaitu pengujian

hingga operating time tercapai. Setelah itu, absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 516 nm (Gulcindkk., 2004 ; Halliwell dan Gutteridge, 1999 ; Kwon and Kim, 2003 ; Pokorniyadkk., 2001). Perlakuan yang sama untuk kontrol positif vitamin C.

#### Identifikasi isolat secara FT-IR

Isolat aktif digerus bersama-sama dalam 200 mg KBr hingga bercampur secara sempurna. Kemudian ditekan dengan cakram tipis atau pelet. Pelet ini kemudian dianalisis menggunakan alat FTIR 100 PERKIN ELMER (Laboratorium Kimia Analisis Farmasi Universitas Gadjah Mada).

#### Identifikasi isolat secara GC-MS

Analisis isolat aktif dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia, Universitas Islam Negeri (UIN) Sunan Kalijaga, Yogyakarta menggunakan AGILENT GC 6890N 5975B MSD, dengan kondisi operasi sebagai berikut :

Oven. Initial temperatur 70 °C (On) , Max temperatur 325 °C, Initial time 2.00 min, Equilibration time 1.00 min, Ramps Rate 10,00, Final temperatur 300, Final time 15,00. Run time : 40.00 min. Front inlet (split/splitless). Mode Split, Initial temperatur 300 °C (On), Pressure 8,80 psi (On), Purge flow 199,9 mL/min, Purge time 0,00 min, Total flow 203,7 mL/min, Gas saver On, Saver flow 20.0 mL/min, Saver time 2.00 min, Gas type Helium. Column 1. Capillary Column. Model Number agilent 19091S-433, HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane, Max temperature 325 °C, Nominal length: 30.0 m, Nominal diameter 250.00 um, Nominal film thickness: 0.25 um, Mode constant flow, Initial flow 1,0 mL/min, Nominal init pressure 8,81 psi, Average velocity 37 cm/sec, Inlet Front Inlet, Outlet MSD, Outlet pressure vacuum.

#### Analisis data

##### Uji antioksidan secara KLT

Penentuan aktivitas antioksidan pada bercak KLT ditunjukkan dengan adanya berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu.

#### Penentuan aktivitas antioksidan

Aktivitas anti oksidan ditentukan menurut cara berikut:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.kontrol}} \times 100\%$$

#### Hasil dan Pembahasan

Daun kesemek dipanen pada tanggal 5 Februari 2010 dari Taman Nasional Gunung Merapi (TNGM), Boyolali, Jawa Tengah. Terhadap

serbuk daun dilakukan maserasi menggunakan pelarut wasbenzen dan metanol. Ekstraksi dengan wasbenzen dilakukan untuk menyari senyawa-senyawa yang bersifat non polar dan menghilangkan zat *ballast* yang terdapat dalam sampel. Senyawa-senyawa dengan kepolaran tinggi akan tersari ke dalam pelarut metanol.

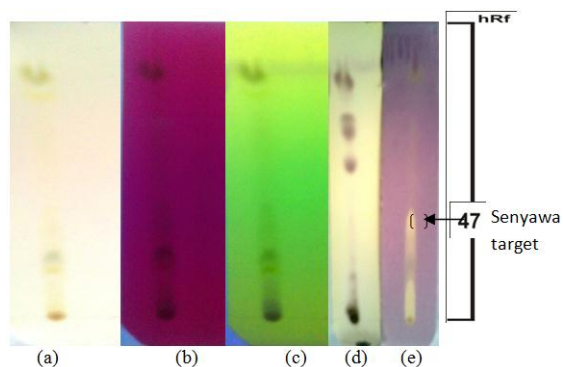
Berdasarkan penelitian antioksidan tumbuhan kesemek oleh Jang dkk (2010), Kim dkk (2006), Ercisli dkk (2008) dan Chen dkk (2008) disebutkan bahwa ekstrak positif antioksidan yang digunakan adalah ekstrak yang bersifat polar sehingga uji pendahuluan untuk ekstrak non polar tidak dilakukan. Uji pendahuluan untuk ekstrak metanol daun kesemek sebagai antioksidan penangkap radikal dilakukan sesuai metode Demirezer dkk (2001), Cavin dkk (1998) dengan modifikasi.

Hasil KLT ekstrak metanol dengan fase gerak kloroform-etil asetat (1:4v/v) terlihat pada gambar 1. Pada bercak dengan  $R_f$  47 menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang ditandai dengan bercak warna kuning dengan latar belakang ungu.

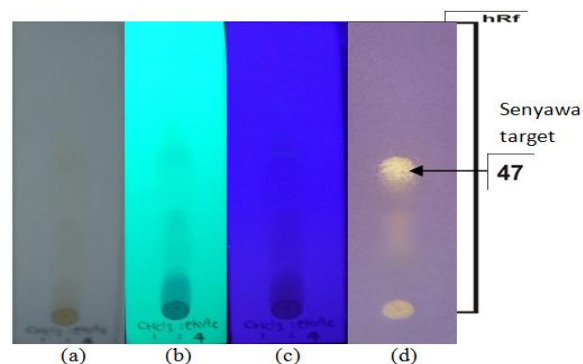
#### Pemisahan secara partisi

Ekstrak metanol daun kesemek dilarutkan dalam pelarut kloroform didalam tabung reaksi kemudian divortex dan disentrifuge beberapa menit sehingga terbentuk endapan (tidak larut kloroform) dan filtrat (larut kloroform). Hasil endapan dilarutkan dengan pelarut metanol divortex dan disentrifuge kembali hingga diperoleh endapan (tidak larut metanol) dan filtrat (larut metanol). Hasil endapan dilarutkan ke dalam pelarut air kemudian divortex dan disentrifuge kembali sehingga dihasilkan fase larut air.

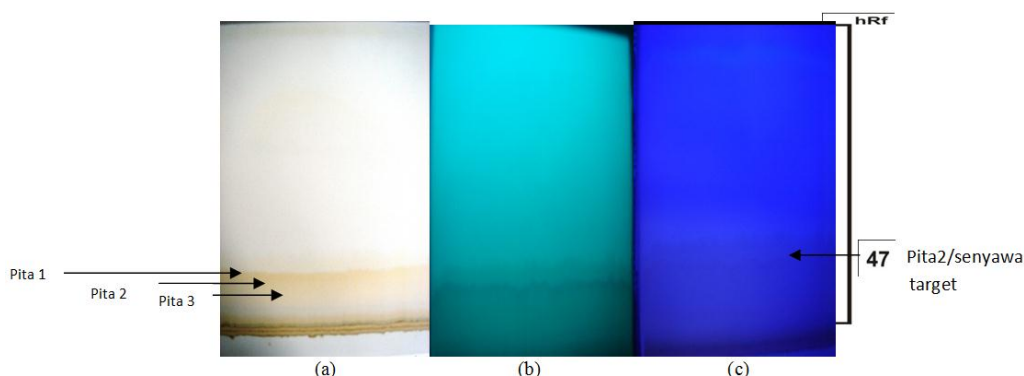
Dari hasil pemisahan secara partisi diperoleh tiga fase yaitu fase larut kloroform (FI), fase larut metanol (FII) dan fase larut air (FIII).



Gambar 1. Profil KLT ekstrak metanol daun kesemek menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>, dan eluen kloroform-etil asetat (1:4v/v). Bercak yang terbentuk diamatidengan sinar tampak (a), lampu UV <sub>254</sub> nm (b) dan <sub>366</sub> nm (c), pereaksi serum sulfat (d) dan DPPH 0,2% (e).



Gambar 2. Profil KLTFII menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>, dan eluen kloroform-etil asetat (1:4v/v). Bercak yang terbentuk diamati dengan sinar tampak (a) lampu UV <sub>254</sub> nm (b) dan <sub>366</sub> nm (c) dan pereaksi DPPH 0,2% (d).



Gambar 3. Profil KLTP hRf 47/pita 2 hasil partisi larut metanol menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> dan eluen kloroform-etil asetat (1:4 v/v). Bercak yang terbentuk diamati dengan sinar tampak (a), lampu UV <sub>254</sub> nm (b) dan <sub>366</sub> nm (c).

#### Pengujian hasil partisi adanya senyawa antioksidan penangkap radikal secara KLT

Hasil uji menunjukkan hanya FII yang memberikan respon positif terhadap DPPH. Gambar 2 menunjukkan respon positif antioksidan yaitu adanya bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu pada beberapa hRf namun yang memiliki resolusi yang baik dan respon spontan positif pada saat penyemprotan dengan pereaksi DPPH 0,2% adalah kromatogram dengan hRf 47.

#### Pemurnian isolat secara Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

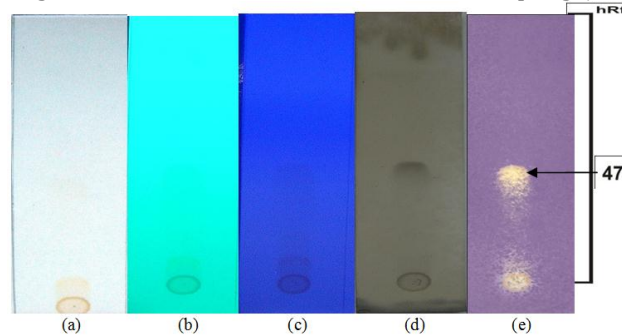
Terhadap FII dilakukan KLTP. Dari hasil KLTP diperoleh 3 pita seperti yang terlihat pada gambar 3. Pita-pita yang diperoleh kemudian diisolasi dan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH 0,2%.

Pita 2 memberikan reaksi positif DPPH dan berwarna ungu kemerahan setelah disemprot dengan serum sulfat setelah dipanaskan dan keduanya menunjukkan hRf yang sama yaitu 47 (gambar 4).

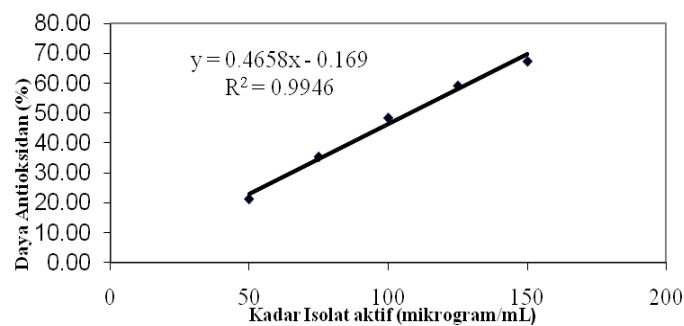
#### Pengujian aktivitas antioksidan penangkap radikal dari isolat aktif

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan IC<sub>50</sub> senyawa antioksidan. Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari plotting terhadap persamaan regresi linier dengan (x) sebagai konsentrasi sampel dan (y) adalah persen aktivitas antioksidan. Kurva regresi linier isolat aktif dan vitamin C menggunakan metode DPPH dapat dilihat pada gambar 5.

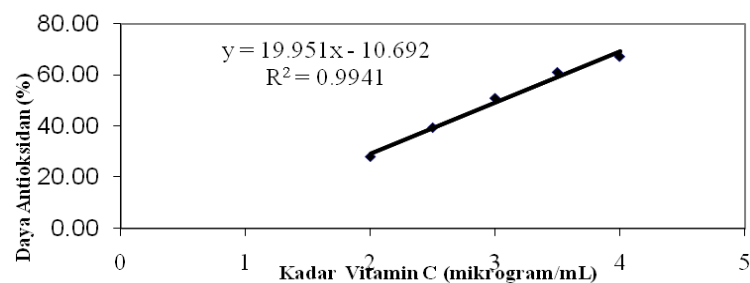
Dari data kurva regresi isolat aktif dan Hasil pengujian menunjukkan bahwa



Gambar 4. Profil KLT isolat aktif dari hasil KLTP menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub>, dan eluen kloroform-etil asetat (1:4v/v). Bercak yang terbentuk diamati dengan sinar tampak (a), lampu UV<sub>254</sub> nm (b) dan <sub>366</sub> nm (c), penampak bercak serum sulfat (d) dan DPPH 0,2% (e).



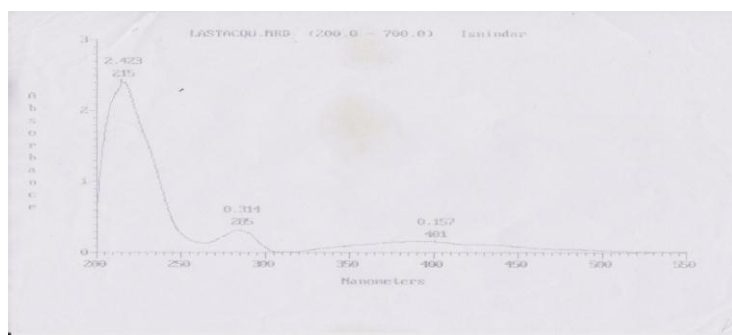
Gambar 5. Kurva regresi linier antara konsentrasi isolat aktif dan persen aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH



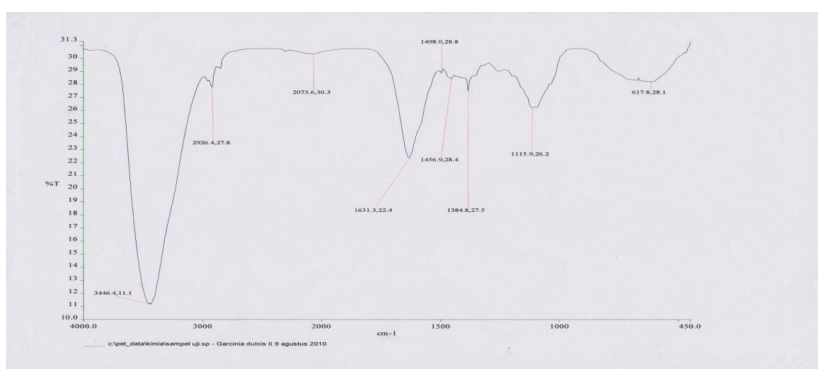
Gambar 6. Kurva regresi linier vitamin C sebagai kontrol positif dan persen aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

vitamin C menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang erat antara konsentrasi dengan % daya antioksidan (% inhibisi). Hal ini diperlihatkan dengan nilai  $R^2$  (koefisien korelasi) di atas 0,9. Nilai  $R^2$  menyatakan bahwa terdapat korelasi antara konsentrasi sampel dengan % inhibisi yang diamati dengan derajat keeratan untuk isolat aktif sebesar 0,9946 dan vitamin C sebagai kontrol positif sebesar 0,9941. Ini menunjukkan bahwa lebih dari 99% derajat penghambatan dipengaruhi oleh konsentrasi bahan, sedangkan kurang dari 1% dipengaruhi oleh faktor lain.

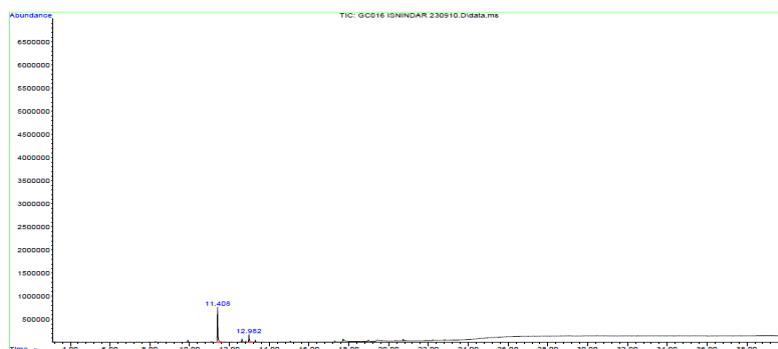
semakin tinggi konsentrasi pelarut, maka semakin tinggi persentase inhibisinya, hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh senyawa antioksidan.



Gambar 7. Spektrum isolat aktif pada panjang gelombang 285 nm dan 401 nm dalam pelarut metanol



Gambar 8. Spektrum isolat aktif pada spektrofotometer FT-IR (KBr).



Gambar 9. Kromatogram GC-MS menghasilkan 2 puncak dengan waktu retensi 11,408 dan 12,982 menit.

Dari data spektroskopi di atas menunjukkan  $IC_{50}$  untuk isolat aktif dan vitamin C masing-masing adalah sebesar 100,0  $\mu\text{g/ml}$  dan 3,00  $\mu\text{g/ml}$ . Vitamin C digunakan karena termasuk golongan vitamin antioksidan yang mampu menangkal berbagai radikal bebas ekstraselular. Hal itu disebabkan vitamin C mempunyai gugus hidroksi bebas bertindak sebagai penangkap radikal bebas dan jika mempunyai gugus polihidroksi akan meningkatkan aktivitas antioksidan (Maslarova, 2001).

#### Identifikasi isolat aktif dengan spektrofotometer UV-VIS

Spektra ultra violet isolat aktif hasil isolasi menunjukkan adanya tiga absorbansi maksimum pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 215 nm (metanol), 285 dan 401 nm (isolat aktif).

Spektra ultra violet isolat aktif hasil isolasi menunjukkan adanya tiga absorbansi maksimum pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 215 nm (metanol), 285 dan 401 nm (isolat aktif).

Tabel I Perbandingan IC<sub>50</sub> isolat aktif dan vitamin C

SENYAWA	Persamaan Grafik	Nilai IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Isolat aktif	$Y=0,4658x-0,169$ $R^2=0,9946$	100,0
Vitamin C	$Y=19,951x-10,692$ $R^2=0,9941$	3,00

### Penentuan gugus fungsional isolat aktif menggunakan FT-IR

Spektrum IR dapat memberikan informasi adanya gugus-gugus fungsional tertentu dan juga tipe ikatan antar atom dalam struktur molekul (Pavia dkk., 1979).

Serapan kuat dan tajam pada 3446,4 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya pita uluran OH (Creswell dkk., 1982). Pita 2926 cm<sup>-1</sup> kemungkinan adalah C-H alifatik, pita tajam pada 1456 dan 1384 cm<sup>-1</sup> adalah gugus alkil. Pita 1255 dan 1115 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya sistem karbon-oksigen-karbon sehingga memperkuat dugaan adanya eter. Serapan pada daerah 1631 cm<sup>-1</sup> yang berintensitas kuat dan tajam mengindikasikan sebagai daerah serapan yang khas untuk ikatan C=C aromatik sederhana yang tersubstitusi oleh satu gugus -OCH<sub>3</sub> (Silverstein dkk., 1981). Karena posisi serapannya yang kurang dari nilai 1700 cm<sup>-1</sup>, maka gugus C=O tersebut dalam keadaan terkonjugasi (Silverstein dkk., 1981). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa struktur dari isolat aktif kemungkinan mengandung gugus -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>, dan C-O-C.

### Analisis kromatografi gas-spektroskopi massa

Untuk mengetahui lebih lanjut kemurnian isolat tersebut dilakukan Kromatografi Gas-Spektrometri Massa. Dengan teknik ini akan diketahui jumlah senyawa yang ada di dalam isolat aktif beserta bobot molekulnya.

Analisis kromatografi gas dari isolat aktif memberikan 2 puncak dengan waktu retensi 11,408 menit dengan indeks kemiripan (*Similarity Index*) sebesar 79,243% teridentifikasi sebagai senyawa methyl eugenol dan 12,982 menit dengan indeks kemiripan (*Similarity Index*) sebesar 20,757% teridentifikasi sebagai senyawa myristicin. Hal ini menandakan bahwa isolat aktif yang dimurnikan belum benar-benar murni.

Menurut Farag dkk (2004) methyl eugenol mempunyai *base peak* m/z 178 dan puncak ion molekul (M<sup>+</sup>) m/z 178, menurut Miele dkk (2001) berdasarkan GC-MS methyl eugenol ; *base peak* m/z 178, puncak ion molekul (M<sup>+</sup>) munculkan pada m/z 178 (100), 163 (25), 152 (10), 147 (24), 135

(9), 115 (11), 107 (18), 103 (23), 91 (26), 77 (11) dan 65 (8), menurut Barr dkk (2000) berdasarkan GC-HRMS methyl eugenol ; *base peak* m/z 178, puncak ion molekul (M<sup>+</sup>) munculkan pada m/z 178, 163 (CH<sub>3</sub>), 151, 147 (OCH<sub>3</sub>), 107.

Berikut disajikan kromatogram GC-MS dengan waktu retensi 11,408 dan 12,982 menit dapat dilihat pada gambar berikut:

Berdasarkan analisis dengan menggunakan spektrofotometer GC-MS senyawa dengan puncak waktu retensi 11,408 menghasilkan spektrum massa dengan puncak-puncak utama pada m/z 178, 163, 153, 147, 135, 115, 107, 91, 77 dan 65. *base peak* munculkan pada m/z 178, puncak ion molekul (M<sup>+</sup>) munculkan pada m/z 178, selanjutnya menunjukkan fragmen pada m/z 147 menyebabkan senyawa ini kehilangan 15 mu yang merupakan gugus CH<sub>3</sub> dan m/z 147 menyebabkan senyawa ini kehilangan 31 mu yang merupakan gugus OCH<sub>3</sub>. Berdasarkan dari penelusuran literatur dan hasil analisis memperkuat dugaan bahwa senyawa yang terdapat pada isolat aktif kemungkinan adalah methyl eugenol. Berikut disajikan spektrum massa dari puncak dengan waktu retensi 11,408 menit dapat dilihat pada gambar berikut:

Selanjutnya puncak dengan waktu retensi 12,982 (gambar 11) menghasilkan spektrum massa dengan puncak-puncak utama pada m/z 192, 161, 146, 131, 103, 91, 77, 65, 53 dan 39. *base peak* munculkan pada m/z 192, puncak ion molekul (M<sup>+</sup>) munculkan pada m/z 192, selanjutnya menunjukkan fragmen pada m/z 177 menyebabkan senyawa ini kehilangan 15 mu yang merupakan gugus CH<sub>3</sub> dan m/z 161 menyebabkan senyawa ini kehilangan 31 mu yang merupakan gugus OCH<sub>3</sub>. Menurut Chen dkk (2010), myristicin mempunyai puncak ion molekul (M<sup>+</sup>) m/z 192. Berat molekul myristicin 192 (Donald dan Barceloux, 2008). Hal ini memperkuat dugaan bahwa senyawa yang terdapat pada isolat aktif kemungkinan adalah myristicin.

Menurut Harborne (1987) senyawa myristicin mempunyai panjang gelombang maksimum (λ) 278 dan 285 nm. Dari data spektra UV-Vis isolat aktif hasil isolasi menunjukkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang (λ) 285 dan 401 nm, artinya isolat aktif pada λ<sub>max</sub> 285 memperkuat dugaan senyawa pada isolat aktif adalah myristicin.

Dari hasil data FT-IR menunjukkan kemungkinan keberadaan gugus -OH pada 3446 cm<sup>-1</sup>, dengan membentuk pita tajam. Menurut Fessenden dan Fessenden (1999) serapan-OH munculkan sebagai pita yang lebar. Hal ini kemungkinan disebabkan sampel belum kering benar sehingga adanya air memberikan pita



serapan tersendiri sebagai gugus -OH. Chefetz dkk (2002) menyatakan bahwa senyawa aromatik dengan substitusi metoksi sangat mudah mengalami oksidasi.

Hasil identifikasi senyawa diatas menunjukkan isolat ini adalah methyleugenol dan myristicin. Keduanya merupakan kelompok dari phenylpropen dari golongan fenilpropanoid dari senyawa fenol alam yang mempunyai cincin aromatik dengan rantai samping terdiri atas tiga atom karbon. Struktur phenylpropen dapat dilihat pada gambar berikut:

## KESIMPULAN

IC<sub>50</sub> isolat aktif dari daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) sebesar 100,0 µg/mL. Golongan senyawa yang terkandung pada isolat aktif dari daun kesemek diperkirakan adalah phenylpropen. Struktur isolat aktif antioksidan dari daun kesemek diperkirakan adalah methyl eugenol (1-Allyl-3,4-dimethoxybenzene) dan myristicin (1,3-benzodioxole, 4 methoxy-6-(2 propenyl)).

## DAFTAR PUSTAKA

- Cavin A, Hostettmann K, Dyatmyko W and Potterat O (1998). Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med.* 64: 393-396.
- Chefetz B, Salloum AP, Deshmukh and Hatcher PG (2002). Structural components of humic acids as determined by chemical modifications and carbon-13 nmr, pyrolysis and thermochemolysis gas chromatography /mass spectrometry. *Soil Science Society of America Journal.* 66 : 1159-1171.
- Chen CY, Wang HM, Chung SH, Lo WL, Yang WL and Yang SC (2010). Chemical constituents from the roots of *Cinnamomum subavenium*. *Chemistry of Natural Compounds.* Vol 46. No.3.
- Chen NX, Fan FJ, Yue X, Wu RX, Li TL (2008). Radical scavenging activity and phenolic compounds in persimmon (*Diospyros kaki* L. Cv. Mopan). *JFS c: food chemistry* (73): Nr.1.
- Creswell CJ, Runquist OA and Campbell MM (1982). *Spectrum analysis of organic compound an introductory programmed text*. Diterjemahkan ke dalam Bahasa Indonesia oleh Kosasih Padmawinata dan Ny. Iwang Soediro. Penerbit ITB. Bandung.
- Donald G and Barceloux DG (2008). Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Article Medical Toxicology of Natural Substances.* Pp 67-70.
- Demirezer LO, Kruuzum UzA, Bergere I, Schiewe HJ and Zeeck A (2001). The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source : anthraquinones and tannin from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*, 58: 1213-1217.
- Ercisli S, Akbulut M, Ozdemir O, Sengul M and Orhan E (2008). Phenolic and antioxidant diversity among persimmon (*Diospyros kaki* L) genotypes in turkey. *I. Journal of Food Sciences and Nutrition.* 59 (6): 477-482.
- Fessenden RJ and Fessenden JS (1999). *Kimia Organik*. Jilid II. diterjemahkan oleh Pujaatmaka AH, Penerbit erlangga. Jakarta.
- Gulcin I, Uguz MT, Oktay M, Beydemir S and Kufrevioglu OI (2004). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*salvia sclarea* L.), Turki. *I. Agric. For.* 28: 25-33.
- Halliwell B, and Gutteridge JMS (1999). *Free radicals in biology and medicine*, 3th ed. Pp. 1-231, 353-425. Oxford University Press. Inc. New York.
- Harborne JB (1987). *Metode fitokimia*. Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro. Penerbit ITB. Bandung.
- Jang CI, Jo KE, Bae SM, Lee JH, Jeon IG, Park E, Yuk GH, Ahn HG, Lee CS (2010). Antioxidant and antigenotoxic activities of different part of persimmon (*Diospyros kaki* cv fuyu) fruit. *J. Medicinal Plants Res.* (4) 2. Pp: 155-160.
- Kim SY, Jeong MS, Kim JS, Jeon IK, Park E, Park RH, Lee CS (2006). Effect of head treatment on the antioxidative and antigenotoxic activity of extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L). *Bioschi. Biochem.* 70(4): 999-1002.
- Kwon YS and Kim CM (2003). Antioksidant constituents from the steam of sorghum bicolor. *Arch. Pharm. Res.* 26 (7): 535-539.
- Maslarova NVY (2001). Inhibiting oxidation cited in Pokorny J, Yanishlieva N and Gordon M. Antioxidant in food. Practical Applications. 42-48. CRC Press. New York.
- Moon KJ and Shibamoto T (2009). Antioxidant assay for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57 (5): 1655-1666.
- Pavia DL, Lampman GM and Kriz-jr GS (1997). Introduction to spectroscopy: a guide for student of organic chemistry. 13-223. WB. Saunders Company. Philadelphia.
- Pokornya J, Yanishlieva N and Gordon M (2001). Antioxidants in food. Practical Applications. 1-123. Wood Publishing Limited. Cambridge. England.
- Silverstein RM, Bassler GC and Morrill TC (1981). *Spectrometric Identification of Organic*



*Isnindar*

*Compound*. Fifth Edition. John Wiley and Sons. New York.